



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et protection des végétaux

## Thème

Isolement, identification et caractérisation des espèces de  
*Trichoderma* agents de lutte biologique et leurs effets antagonistes  
contre *Fusarium oxysporum f. sp ciceris*

Présenté par : BENTARAA Meriem et KSOURI Saliha

Devant le jury :

Président : M<sup>lle</sup> BELKASMI. F MAB (Université de BordjBouAriridj)

Encadrant : M<sup>lle</sup> MAAFi. O MAB (Université de BordjBouAriridj)

Examineur : M<sup>r</sup> MAAMERI. K MAA (Université de BordjBouAriridj)

Année universitaire : 2014/2015

## Conclusion générale

L'efficacité des traitements chimiques a montré ses limites avec l'apparition de nouveaux traitements suite aux problèmes liés aux résidus de pesticides appliqués. Les recherches sur la lutte biologique ont comme objectif principal le développement et l'amélioration de moyens alternatifs de lutte afin de limiter l'utilisation des pesticides chimiques synthétiques et leurs impacts négatifs sur l'environnement et la santé publique.

En effet, les mycètes constituent les microorganismes privilégiés pour la lutte biologique, cela grâce à leurs caractéristiques biologiques qui permettent une multiplication et une colonisation rapide des surfaces et la survie pour long temps sous différentes conditions environnementales.

Ce travail porte sur l'isolement, l'identification et l'effet antagoniste des *Trichoderma* isolés à partir du sol. Les échantillons utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir de différentes wilayas de l'Algérie à savoir, Mascara, Aïn Timouchent, Relizane, Sidi Bel Abbès, Skikda, Guelma et Constantine.

L'étude des caractères macroscopiques portant sur la couleur, l'aspect de colonie et le revers des boîtes, et microscopiques dont la forme des thalles et des spores, des souches fongiques isolées, a permis d'identifier 7791 isolats, répartis en 11 genres fongiques.

L'analyse des résultats obtenus montre effectivement la dominance de genre *Aspergillus* avec une fréquence d'isolement de (27.24 %) divisé en trois espèces différentes comme suite : *Aspergillus terreus* (19.4%) ; *Aspergillus niger* (5.08%) ; *Aspergillus sp* (2.96%). Le genre *Penicillium* se situe en deuxième place avec un pourcentage de (14.45 %) suivi par le genre *Fusarium* (12.1%) aussi une fréquence de (11.53 %) pour l'espèce *Rhizomucor sp* et (11.06%) pour le genre *Trichoderma*. Par contre, une faible fréquence d'isolement a été constatée pour les autres genres *Epicoccum* (1.95%), *Rhizopus* (1%), *Mucor* (0.39%) et *Cladosporium* (0.03%).

Les observations ont montré que les *Trichoderma sp* se développent facilement *in vitro*, avec un rythme de croissance élevé. En effet, la taille des colonies de *Trichoderma sp* est relativement plus importante que celle du reste des espèces fongiques présentes dans les échantillons. La différence des stations participe sur la différence des espèces.

L'isolement des *Trichoderma* a été effectué à partir de 26 échantillons des sols rhizosphériques. Un total de 151 souches appartenant au genre *Trichoderma* ont été isolés à partir de milieu de culture PDA. Il s'est avéré que les 151 isolats fongiques appartiennent à 37 groupes phénotypiques, différents, dont *T. viride* et *T. harzianum* sont le plus dominant avec une

fréquence de (20.52%) et (12.58%) respectivement. *T.atroviride*, *T.virens* (9.27%), *T.aggrissivum* (7.94%), *T.virideisenc* (3.31%), *T.citrina* (2.65%), *T.koningii*, *T.placentula*, *T.crystalligena*, *T.subeffusa*, *T.luteocrystallina*, *T.lutea* (1.32%), *T.neorufoides* et *T.austriaca* (0.66%) ; le reste du pourcentage fractionné sur les 18 espèces indéfinie.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre *T.harzianum* et FOC, montrent une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène se marquant par une lyse importante, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium du *Trichoderma* sur celui du FOC.

Les tests de confrontation directe réalisés in vitro, entre les isolats de *Trichoderma* sp, et le FOC ont montré une action inhibitrice de *Trichoderma* sur le FOC en culture mixte.

La zone d'inhibition la plus importante a été noté pour la classe 1 comporte les souches suivantes : *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma lutea*, *Trichoderma austriaca* avec la meilleure inhibition de la croissance de FOC avec un pourcentage (100%).

La deuxième classe comporte la souche *Trichoderma subeffusa* et *Trichoderma placentula*, *Trichoderma luteocrystallina*, *Trichoderma viride* et *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma citrina*, *Trichoderma harzianum*, Sp 1, Sp 3, Sp 4, Sp 6 qui sont caractérisées par une forte inhibition de la croissance mycélienne de FOC et qui allongée de (98% à 80%).

Le *Trichoderma neorufoides*, *Trichoderma viridesens*, *Trichoderma aggrissivum*, *Trichoderma Sp 2*, *Trichoderma Sp 5*, constituent la troisième classe dont la zone d'inhibition est entre (79% à 68%).

La quatrième classe est la dernière de (5.17%) c'est *Trichoderma crystalligena* de faible inhibition.

Le test de confrontation indirecte (test de substance volatile) des souches de *Trichoderma* permet d'obtenir les résultats suivants :

Le premier groupe présente la souche *Trichoderma polysporum* et l'espèce indéfinie Sp 2, qui exprime la meilleure inhibition de la croissance du FOC avec un pourcentage de (93.75%) suite la souche *Trichoderma atroviride* (92.5%) ainsi *Trichoderma subeffusa* de pourcentage (91.25%)

Le deuxième groupe représente les souches *Trichoderma Austriaca*, *Trichoderma luteocrystallina*, *Trichoderma citrina*, *Trichoderma aggrissivum*, *Trichoderma lutea*, *Trichoderma Sp1*, *Trichoderma Sp3*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma neorifoides* signifie

une forte inhibition de la croissance mycélienne de FOC avec le pourcentage de (88.75% à 61.25%).

Le troisième groupe indique les souches *Trichoderma placentela*, *Trichoderma viride* *Trichoderma virens* exprime une moyenne inhibition de la croissance du FOC avec un pourcentage (56.25% à 13.75%).

Le quatrième groupe présente les souches *Trichoderma crystalligena*, *Trichoderma viridesens*, *Trichoderma* Sp 5 montre une inhibition nulle (0%) de la croissance du FOC.

Les résultats obtenus suite à la confrontation indirecte montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches de FOC exercée par *Trichoderma* sp. Contrairement au test de confrontation directe, on remarque que la croissance mycélienne continue d'évoluer avec le temps.

La souche *Trichoderma polysporum*, exprime la meilleure zone d'inhibition de la croissance du FOC avec une fréquence de 100%. Par contre la souche *Trichoderma crystalligena* a enregistré la zone d'inhibition la plus faible 5 ,17%.

Enfin, le développement d'une méthode de traçage et l'étude de l'écologie des agents antagonistes retenus peut être menée dans le but d'étudier l'influence des facteurs environnementaux dans l'activité de protection sur terrain, d'évaluer des méthodes d'application de l'antagoniste, son adaptation, sa survie et les exigences éco-toxicologiques, et permettront ainsi de développer un produit à base de *Trichoderma* qui garantira une efficacité durable sur terrain.

Annexe

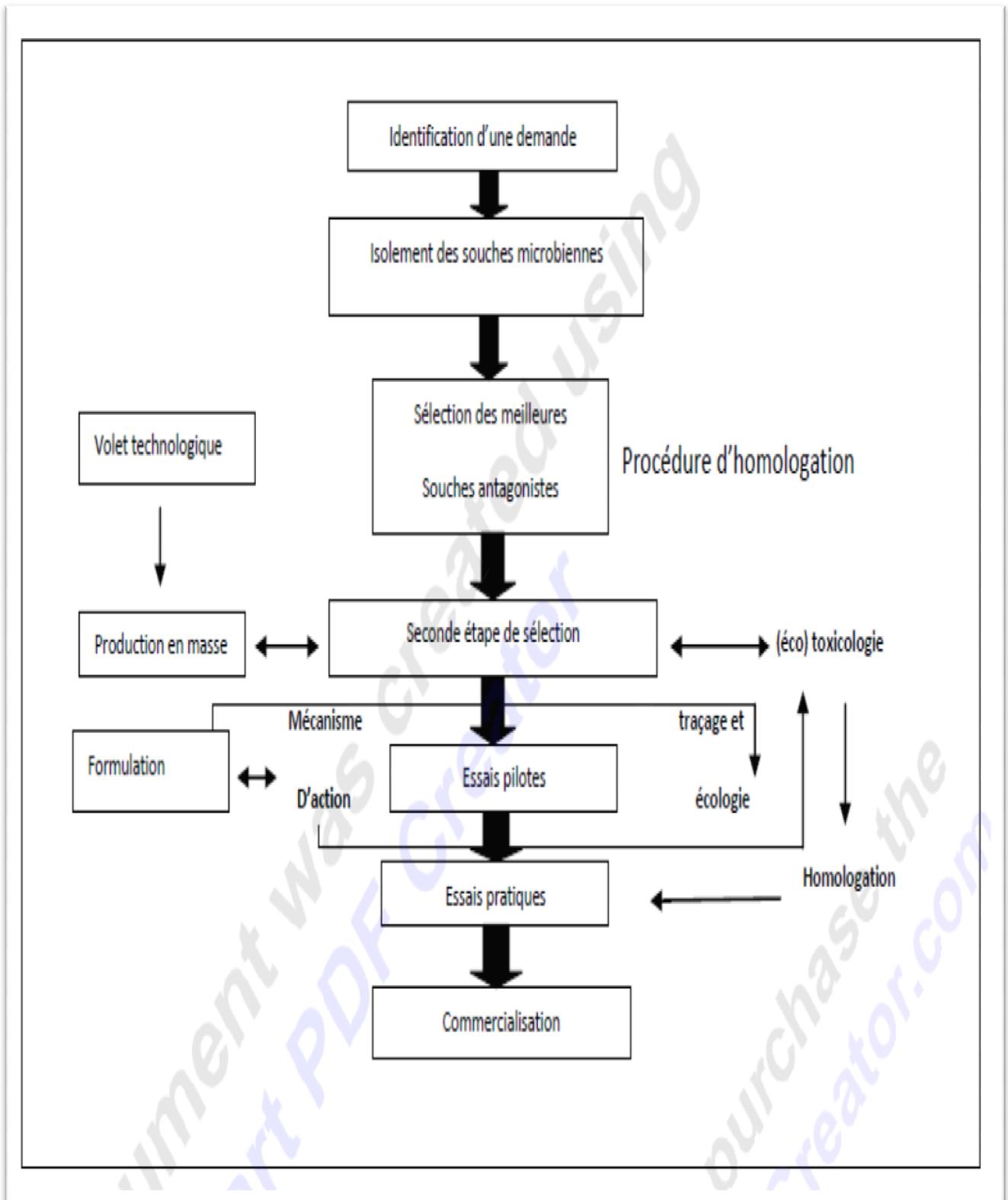


Figure 1 : Etapes nécessaires au développement des biopesticides (Lepoivre, 2003).

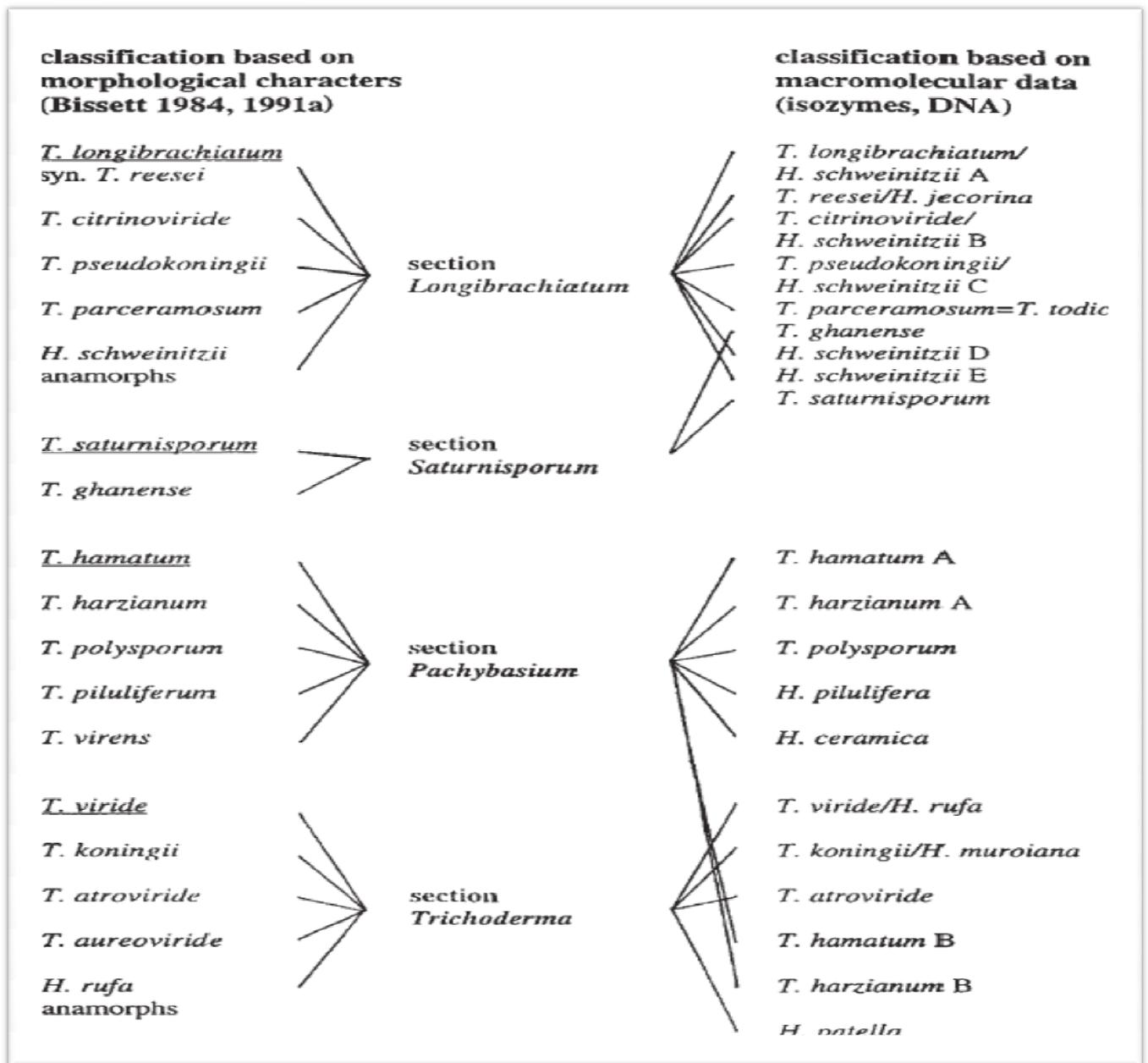


Figure 2 : Comparaison de la classification du genre *Trichoderma* selon l'isozyme et des données ADN avec Taxonomie morphologiquement basée par Bissett (1984, 1991a-cin Christian et Harman, 2002)

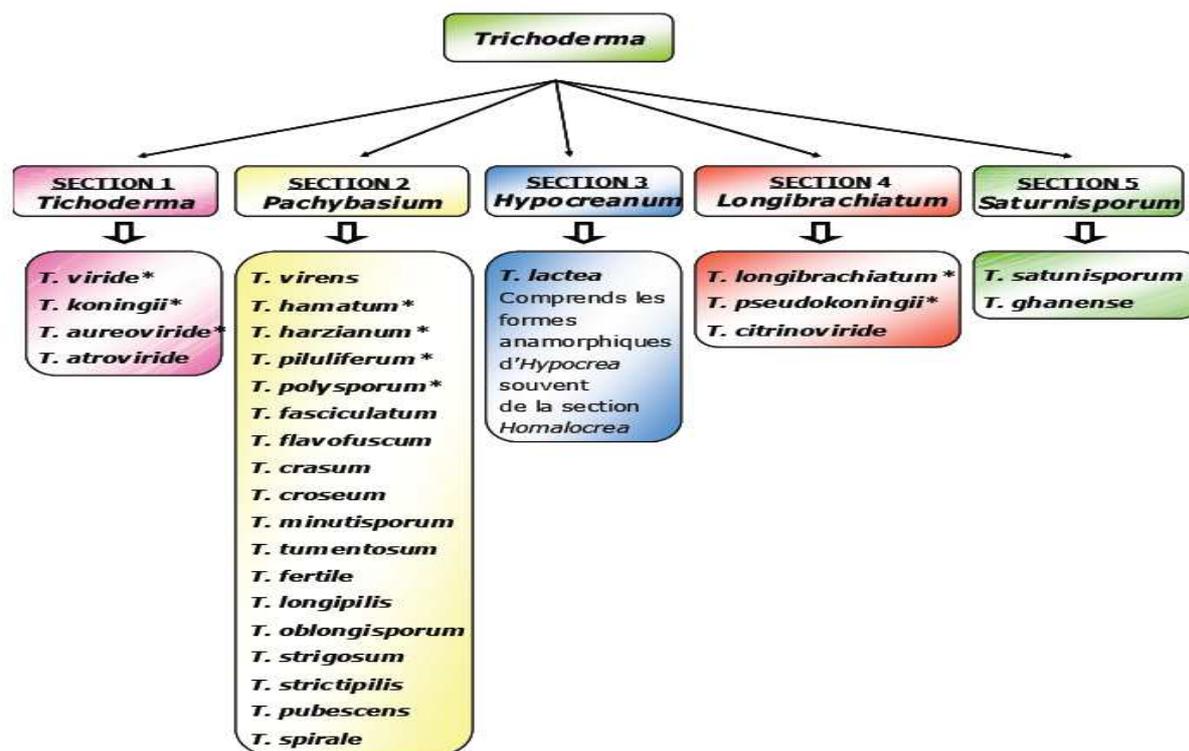


Figure 3: Les 5 sections systématiques de *Trichodermasp.* et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bissett (1991a et b). \* Les espèces agrégées de Rifai (1969 in Mastapha, 2006 ; Meriem, 2010).

Tableau I : Comparaison des données sur l'exécution de la lutte chimique et biologique (Lenteren, 2006).

	lutte chimique	lutte biologique
Nombre d'ingrédients	> 1 million	2
Rapport de succès	1:200000	01:10
Coûts développemental	400 million	2 million d' U\$
Temps de développement	10 ans	10ans
Avantage /rapport coûté	01:02	20:01
Risque de résistance	grand	petit
Spécilité	très petit	très grand
Effets secondaires nocifs	beaucoup	nul/peu

Tableau II : Avantages et l'inconvénient de l'utilisation des agents microbiens en comparaisons avec les fongicides (Lenteren, 2006).

Désignations Produit chimique		Agents microbiens
<b>Coût et investissements</b>		
recherche et développement	20 millions US\$	0,8-1,5 millions US\$
Qualité et acquisition du marché	40 millions US\$	0,8-1,5 millions US\$/année
Données toxicologiques	10 millions US\$	0,5 millions US\$
Elaboration de brevets	Bien établi	en voie d'établissement
Découvertes	Sélection de 15,000 pour identifier un produit	sélection rationnelle pour une maladie spécifique déterminé
<b>Efficacité</b>		
Spectre d'activité	généralement large	généralement étroit
Résistance	souvent développée	non connue
Type d'action	Préventive et curative	Préventive et curative
<b>Santé</b>		
Santé des opérateurs	peuvent être nocifs	risque très faible
Impact environnemental	Accumulation dans les chaînes alimentaires	risques très faibles
Résidus	Intervalle avant récolte souvent recommander après traitement	très faibles à inexistant Les récoltes sont utilisées sans risque

**Tableau III : Origine des échantillons:**

n° échantillon	Source d'échantillon
1	Sfisef(Sidi belabes)
2	Benbrahim(Sidi belabes)
3	Bourawi(Relizene)
4	Bnitalla(Sidi belabes)
5	Relizene(Relizene)

<b>6</b>	Broal (Constantine)
<b>7</b>	Ghrayassia(Mascara)
<b>8</b>	Bnialloni(Mascara)
<b>9</b>	Oubellil(Sidi belabes)
<b>10</b>	Benizeltis(Relizene)
<b>11</b>	Twafia Skikda(Skikda)
<b>12</b>	Oued Tromlia(Constantine)
<b>13</b>	Sfisef 1(belabes)
<b>14</b>	Oubellil 1(Ain. Timouchent)
<b>15</b>	Sidi Dahouzir(Sidi belabes)
<b>16</b>	Bnizeltis(Relizene)
<b>17</b>	Bradid(Relizene)
<b>18</b>	Sidi Belbouch(Sidi belabes)
<b>19</b>	Bouraulia Khroub(Constantine)
<b>20</b>	Oued Znati 1(Guelma)
<b>21</b>	Oued Znati 2(Guelma)

22	F.P.Bounaulara(constantine)
23	Oued Znati 3(Guelma)
24	Boorawia 1(Skikda)
25	Rahmouma(Constantine)
26	Ain Trab(Guelma)

**Tableau VI : analyse du sol de 26 échantillon**

		Station		Station	<i>P Olsen</i>	<i>pH</i>	<i>CE</i>	<i>Azote</i>
1	GUELMA	Ouedzneti1	1	Ouedzneti1	4,5	7.3	188,55	1,9
1	GUELMA	Ouedzneti1	1	Ouedzneti1	4,8	7,8	170,33	1,85
1	GUELMA	Ouedzneti1	1	Ouedzneti1	4,29	7,5	156,99	1,9
1	GUELMA	Aintrab	2	Aintrab	6,3	8.2	140,82	1,75
1	GUELMA	Aintrab	2	Aintrab	7,14	7,28	176,69	1,7
1	GUELMA	Aintrab	2	Aintrab	5,04	8,09	160,29	1,75
1	GUELMA	Ouedznati3	3	Ouedznati3	2,22	8.30	174,52	1,3
1	GUELMA	Ouedznati3	3	Ouedznati3	2,37	8,44	159,3	1,1
1	GUELMA	Ouedznati3	3	Ouedznati3	2,58	8,15	173,55	1,2
1	GUELMA	Ouedznati2	4	Ouedznati2	4,5	7.89	143,73	1,47
1	GUELMA	Ouedznati2	4	Ouedznati2	6,51	8,01	134,22	1,54
1	GUELMA	Ouedznati2	4	Ouedznati2	3,21	7,72	197,55	1,46
2	RELZENE	Relizene	5	Relizene	2,52	7.50	273,09	2,5
2	RELZENE	Relizene	5	Relizene	2,67	8,15	248,03	2,34
2	RELZENE	Relizene	5	Relizene	2,67	7,48	262,96	2,27
2	RELZENE	Bnizeltis	6	Bnizeltis	2,94	7.9	203,29	1,23
2	RELZENE	Bnizeltis	6	Bnizeltis	2,88	7,37	212,46	1,3
2	RELZENE	Bnizeltis	6	Bnizeltis	3	7,21	217,09	1,7
2	RELZENE	Bnizeltis1	7	Bnizeltis1	3,66	7.20	842,69	1,67
2	RELZENE	Bnizeltis1	7	Bnizeltis1	3,93	7,53	758,77	1,9
2	RELZENE	Bnizeltis1	7	Bnizeltis1	3,09	7,13	711,17	1,8
2	RELZENE	Bradid	8	Bradid	4,17	7.8	273,04	2,6
2	RELZENE	Bradid	8	Bradid	3,51	7,15	286,66	2,1
2	RELZENE	Bradid	8	Bradid	4,98	7,24	266,5	2,5
2	RELZENE	Bourawi	9	Bourawi	3,66	7.77	187	0,93
2	RELZENE	Bourawi	9	Bourawi	3,93	8,14	169,35	0,9

2	RELZENE	Bourawi	9	Bourawi	3,39	7,44	166,71	0,9
3	SKIKDA	Baorawia1	10	Baorawia1	10,35	8.17	170,89	0,93
3	SKIKDA	Baorawia1	10	Baorawia1	9,81	7,85	187,38	0,9
3	SKIKDA	Baorawia1	10	Baorawia1	10,02	8,06	164	0,91
3	SKIKDA	TwafiaSkikda	11	TwafiaSkikda	4,74	7.58	217,72	1,8
3	SKIKDA	TwafiaSkikda	11	TwafiaSkikda	4,74	7,6	227,86	1,65
3	SKIKDA	TwafiaSkikda	11	TwafiaSkikda	4,89	7,36	230,32	1,7
4	SIDI BEL ABBES	SidiBbelbouch	12	SidiBbelbouch	2,7	8.1	172,47	1,65
4	SIDI BEL ABBES	SidiBbelbouch	12	SidiBbelbouch	3,03	7,35	159,61	1,6
4	SIDI BEL ABBES	SidiBbelbouch	12	SidiBbelbouch	2,64	7,6	175,86	1,5
4	SIDI BEL ABBES	Benbrahim	13	Benbrahim	3,3	7.48	239,54	2,54
4	SIDI BEL ABBES	Benbrahim	13	Benbrahim	2,85	7,71	218,26	2,71
4	SIDI BEL ABBES	Benbrahim	13	Benbrahim	3,36	7,44	207,1	2,754
4	SIDI BEL ABBES	oubellil	14	oubellil	3,66	7.17	201,31	2,6
4	SIDI BEL ABBES	oubellil	14	oubellil	3,99	7,95	195,73	2,9
4	SIDI BEL ABBES	oubellil	14	oubellil	3,39	7,89	172,04	2,8
4	SIDI BEL ABBES	Sfisel	15	Sfisel	2,88	7.77	276,34	1,98
4	SIDI BEL ABBES	Sfisel	15	Sfisel	1,5	8,14	222,05	2,32
4	SIDI BEL ABBES	Sfisel	15	Sfisel	0,45	7,44	228,84	1,2
4	SIDI BEL ABBES	sididahouzir	16	sididahouzir	3,3	8.20	147,1	2,2
4	SIDI BEL ABBES	sididahouzir	16	sididahouzir	3,6	7,27	163,59	2,7
4	SIDI BEL ABBES	sididahouzir	16	sididahouzir	3,6	6,86	141,73	2,2
4	SIDI BEL ABBES	Bnitalla	17	Bnitalla	5,55	7.67	241,02	2,1
4	SIDI BEL ABBES	Bnitalla	17	Bnitalla	5,4	8,22	204,6	2,15
4	SIDI BEL ABBES	Bnitalla	17	Bnitalla	5,46	7,3	242,7	2,31
5	CONSTANTINE	Rahmouma	18	Rahmouma	7,26	8.14	182,22	1,5
5	CONSTANTINE	Rahmouma	18	Rahmouma	7,23	7,37	191,13	1,41
5	CONSTANTINE	Rahmouma	18	Rahmouma	7,29	8,05	170,24	1,33
5	CONSTANTINE	FPBounawara	19	FPBounawara	7,65	8.14	178,55	0,74
5	CONSTANTINE	FPBounawara	19	FPBounawara	8,31	8	173,41	0,81
5	CONSTANTINE	FPBounawara	19	FPBounawara	6,69	7,48	161,59	0,71

5	CONSTANTINE	BourauliaKhr	20	BourauliaKhr	5,43	8.03	163,76	0,96
5	CONSTANTINE	BourauliaKhr	20	BourauliaKhr	5,61	7,59	159,16	0,85
5	CONSTANTINE	BourauliaKhr	20	BourauliaKhr	5,25	7,47	167,56	0,71
5	CONSTANTINE	OuedTromlia	21	OuedTromlia	2,46	7.5	222,79	1
5	CONSTANTINE	OuedTromlia	21	OuedTromlia	2,73	8,01	227,21	0,8
5	CONSTANTINE	OuedTromlia	21	OuedTromlia	2,91	7,44	234,52	1
5	CONSTANTINE	Broal	22	Broal	4,65	6.28	253,1	1,4
5	CONSTANTINE	Broal	22	Broal	5,85	7,82	230,48	1,9
5	CONSTANTINE	Broal	22	Broal	3,6	7,59	246,25	1,7
6	MASCARA	bniallouni	23	bniallouni	3,45	6.97	222,83	1,5
6	MASCARA	bniallouni	23	bniallouni	3,84	7,86	207,85	1,7
6	MASCARA	bniallouni	23	bniallouni	3,12	7,81	185,19	1,77
6	MASCARA	Ghrayassia	24	Ghrayassia	5,4	6.76	184,17	2,4
6	MASCARA	Ghrayassia	24	Ghrayassia	4,77	7,83	191,55	1,95
6	MASCARA	Ghrayassia	24	Ghrayassia	6,24	7,86	190,72	2
7	Ain Timouchent	Oubellil1	25	Oubellil1	4,05	7.75	297,93	2,91
7	Ain Timouchent	Oubellil1	25	Oubellil1	4,2	7,82	296,08	3,1
7	Ain Timouchent	Oubellil1	25	Oubellil1	4,2	6,9	297,91	2,88
8	belabbes	Sfisef 1	26	Sfisef 1	4,86	7.43	152,43	2,3
8	belabbes	Sfisef 1	26	Sfisef 1	4,44	8,01	182,85	1,94
8	belabbes	Sfisef 1	26	Sfisef 1	5,28	7,82	163,34	2,4

## 1. Techniques d'échantillonnage

Le prélèvement des échantillons a été fait dans différentes régions d'Algérie. De chaque région d'études, 500 g du sol ont été prélevés aseptiquement à la profondeur de 20 cm selon la norme ISO10381-1994 pour les analyses microbiologiques.

Chaque échantillon était mis dans des sachets étiquetés, ensuite transportés au laboratoire et conservés à 4 C° en vu de leurs analyses.

## 2. Analyse du sol

2.1. **L'analyse physique** : aussi appelée analyse granulométrique, renseigne sur la composition du sol et en particulier sur la taille des particules des plus fines, les argiles, jusqu'aux plus grosses, les cailloux.

- Détermination de la Texture du sol après le tamisage des 26 échantillons du sol, avec un diamètre de 0,002, 0,02 et 0,2 mm on a pesé 100g du sol.

2.2. **L'analyse chimique du sol** : permet de déterminer avec précision le contenu du sol en éléments minéraux indispensables à la croissance des plantes.

### 2.3. Mesure de la conductivité électrique

Elle traduit la concentration saline totale de la solution. Elle est directement proportionnelle à la somme des ions en solution. La relation entre la CE et la somme des cations ou anions est la suivante :

Charge saline en g/l = CE (mmohs/cm) X 0.58

### Mode opératoire



**Figure 05 : un conductimètre**

### L'utilisation du conductimètre

- Etalonner l'appareil de mesure ; mesurer la température et la conductivité électrique d'une solution de KCl 0.02 N.
- Mesurer la conductivité électrique de la solution extraite : rincer l'électrode, mesurer la température et la conductivité de la solution extraite.

### 2.4. Détermination pH du sol

Dans le sol, les phénomènes de fixations et d'échanges sont le fait de la fraction colloïdale et de l'humus. Dans les conditions normales, ces colloïdes sont électronégatifs et manifestent une aptitude prédominante à échanger des cations.

\* les cations métalliques :  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$

\* les cations hydrogène :  $\text{H}^+$

### Détermination du pH

#### Méthodes électro métrique



Figure 06 : un pH mètre

On utilise un pH mètre à électrode de verre préalablement étalonné à l'aide de solutions tampons de pH connus.

La réaction du sol se détermine sur une suspension aqueuse dans laquelle le rapport sol/eau est de 1/2,5.

#### 1- Mode opératoire

##### \* pH réel :

- peser 100g de terre, les placer dans un béccher de 100 ml.
- Ajouter 50 ml d'eau distillée, bouillie et refroidie.
- Agiter pendant quelques minutes.

- Laisser reposer pendant 15 mn, puis mesurer le pH de la suspension avec le pH mètre : c'est le pH d'eau.

## **2.5. Dosage d'Azote et le phosphore**

Le dosage d'Azote et le phosphore a été réalisés au niveau de laboratoire de L'INRA d'Algerie.

## **2.6 Origine des échantillons**

Les échantillons utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir des différentes wilayas de l'Algérie à savoir: Mascara, Ain Timouchent, Relizene, Sidi Bel Abbes, Skikda, Guelma et Constantine (voir annexe Tableau III).

## **3. Isolement et purification de *Trichoderma sp***

### **Techniques d'isolement :**

Les microorganismes ont été obtenus, par isolement direct, à partir du sol selon la méthode décrite par Davet&Rouxel (1997). L'analyse de la microflore a été conduite selon la technique des suspensions dilutions, telle qu'elle est décrite par Rapilly1968, Davet, 1996 ; Davet et Rouxel, 1997. Cette technique comprend plusieurs étapes, allant de la préparation des dilutions jusqu'à l'interprétation des résultats (Rapilly1968). Les échantillons du sol ont été préalablement séchés, broyés et calibrés par tamisage.

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du sol en ajoutant 10g du sol à 90 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation pendant 30 min. Cette solution a servi pour préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 10 ml de la solution à 90 ml d'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de  $10^6$ .

Au moment de l'analyse, 10 ml de chaque dilution sont versés dans une fiole d'ermenmeyer contenant 90 ml du milieu d'isolement PDA, maintenu en surfusion au bain-marie entre 37° et 40C°. Il est important de veiller à ce que la température ne soit pas trop élevée, ce qui aurait pour conséquence d'éliminer les champignons les plus thermosensibles.

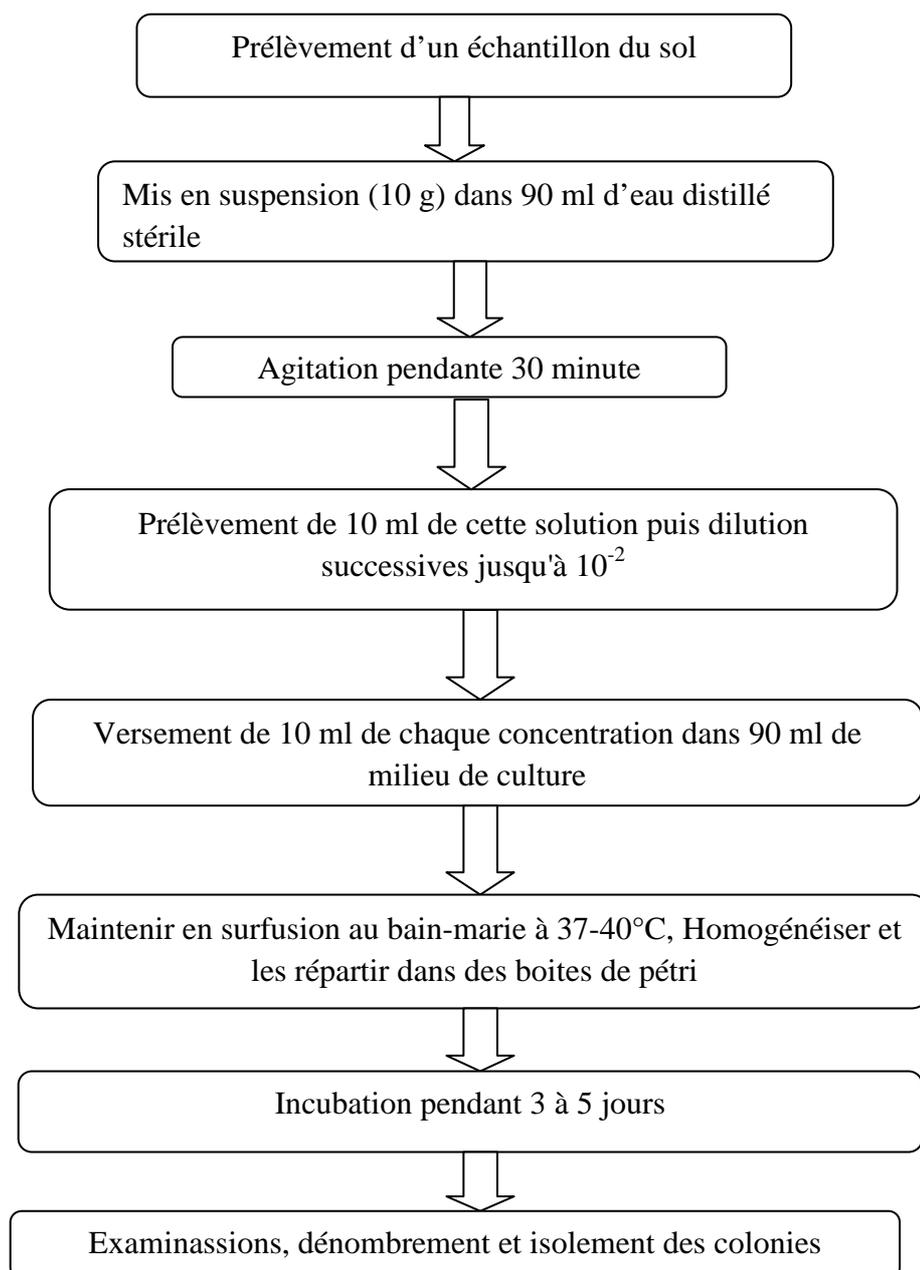
L'homogénéisation est réalisée par agitation manuelle des boîtes par un mouvement circulaire sur plan horizontal. Les boîtes ont été incubées à 28-30C° pendant six jours (Botton et al., 1990).

### **3.1.1. Milieux de cultures utilisés**

#### **3.1.1.1. Milieu PDA**

Le milieu de culture utilisés pour l'isolement des champignons du sol c'est le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Mouria et al., 2013).

- 200 g pomme de terre
- 20g Agar agar
- 15g glucose
- 1000 ml eau distillé



**Figure 07 :** Schéma récapitulatif de méthode d'isolement des champignons du sol

### 3. 2. Purification

Les microorganismes isolés ont été purifiés par deux ou trois repiquages successifs, monospore ou mono-colonie. Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code. La conservation des microorganismes ainsi désigné se fait au congélateur à une température de 5C°.

#### **4. Identification des champignons**

##### **4.1. Obtention de la culture monospores**

Pour étudier la variabilité culturale et pathogénique des isolats, il est nécessaire de réaliser des cultures monospores (John, 1969). L'obtention des cultures monospores est réalisée selon la méthode décrite par (Belabid, 2003). Une suspension de spore est diluée dans l'eau distillée stérile, de façon à obtenir une concentration voisine de 20 spore/ml. Une goutte de suspension contenant

Généralement 2 à 5 spores sont déposées et étalées en stries à la surface du milieu PDA en boîte de Pétri. Après 24 heures d'incubation à l'obscurité et à 25C°, les germinations issues d'une spore unique sont d'abord repérées, au fort grossissement de la loupe binoculaire puis prélevées stérilement et déposées séparément sur le milieu de culture PDA en boîte de Pétri.

Après deux semaines d'incubation, le comportement de chaque thalle issu de la germination des spores est observé (aspect du mycélium et pigmentation). Si tous les thalles présentent des caractères morphologiques identiques entre eux et à ceux de la culture mère, un seul est choisi pour constituer le clone représentatif de l'isolat de départ. En revanche si différents types morphologiques apparaissent dans les clones d'un même isolat, ils sont tous conservés comme tête de clone, étant représentatif d'une morphologie donnée et d'une éventuelle diversité génétique de l'isolat originaire.

L'observation des colonies est faite sept à huit jours après la mise en culture. Les colonies sont ensuite déterminées, ce qui permet d'établir la fréquence d'isolement de chaque espèce fongique pour chaque échantillon.

##### **4.2. Les critères d'identification**

###### **4.2.1. Macroscopiques**

L'analyse macroscopique porte essentiellement sur les caractères culturels, la forme des colonies (arrondie, rayonnante...), l'aspect du mycélium aérien (dense, poudreux...), la couleur de la colonie dépend fréquemment du milieu utilisé, la sporulation, ainsi que le revers de la culture qui donne une idée sur la pigmentation du milieu.

###### **4.2.2. Microscopiques**

L'identification des espèces est réalisée par observation des caractères microscopiques sous microscope optique (mycélium, Conidiophores, conidiogénèse, conidies, structures de résistance, éventuellement forme sexuée ...), après une série de repiquages successifs jusqu'à purification du champignon, en utilisant le bleu de coton comme liquide de montage et on se réfère à différentes clés de détermination : Gilman (1957) ; Barnett (1960) ; Ellis (1971) ; Ellis (1976) ; Domsch et al, (1980).

## **5. Test d'antagonisme**

Durant les dernières décennies du siècle dernier, des recherches considérables ont maintes fois démontré que plusieurs microorganismes de diverses origines phylogénétiques sont capables d'inhiber différents agents pathogènes.

Les microorganismes à l'origine de cette inhibition utilisent plus d'un mécanisme pour la suppression des pathogènes et la réduction de l'incidence des maladies à savoir:

Compétition, antibiose ou parasitisme (Mezaacche Samia, 2012).

D'après Monte, (2001) le champignon imparfait de *Trichoderma* à l'application d'antagonisme contre les mycètes phytopathogène pour lutter contre les maladies, peu de contraintes ont la capacité de tuer les agents pathogène des plantes sous la diversité des conditions environnementales (Ashwin G. Lunge, 2012)

Les espèces de *Trichoderma* ont été utilisées en tant qu'agents de contrôle biologique contre un éventail de champignon phytopathogène pendant plusieurs années (Wiater, 2011).

## **4.1. Matériels biologiques**

### **4.1.1. L'agent pathogène**

Les isolats de *Fusarium* utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir des plants de pois chiche présentant des symptômes de flétrissement et de jaunissement des feuilles. Ces derniers ont été prélevés à des plantes de pois chiche infectées (*Cicer arietinum*) par le *Fusarium*.

### **4.1.2. L'agent antagoniste**

L'agent antagoniste utilisé pour lutter contre le *Fusarium oxysporium* est le *Trichoderma* sp ce dernier a été isolé à partir d'un sol algérien et il est cultivé sur PDA à 25°C. Les cultures utilisées pour ces essais sont âgées de 10 jours.

## **4.2. Méthodologie de travail**

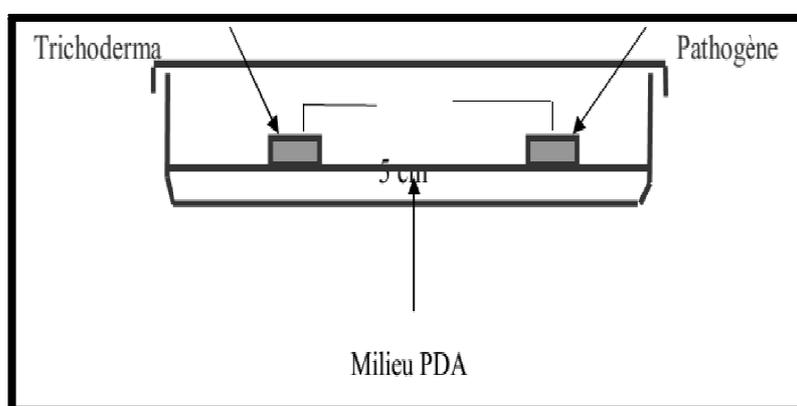
L'activité antagoniste *in vitro* du *Trichoderma* sp vis-à-vis de *F.oxysporium* a été étudiée selon deux méthodes:

#### 4.2.1 La technique de confrontation directe

Cette méthode appelée encore « technique des cultures opposées », consiste à déposer dans des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu « PDA » à 4cm l'un de l'autre, deux explants de 8 mm de diamètre provenant des cultures des deux champignons (parasite et antagoniste).

Au cours de cette expérimentation, trois répétitions ont été retenues pour chaque test. Les témoins sont représentés par des boîtes de Pétri contenant uniquement le champignon pathogène. L'ensemble des boîtes est placé à une température de 25 C° et à la lumière continue.

L'évolution de la croissance mycélienne est effectuée toutes les 24 heures par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon pathogène (Benkadaet al., 2002).



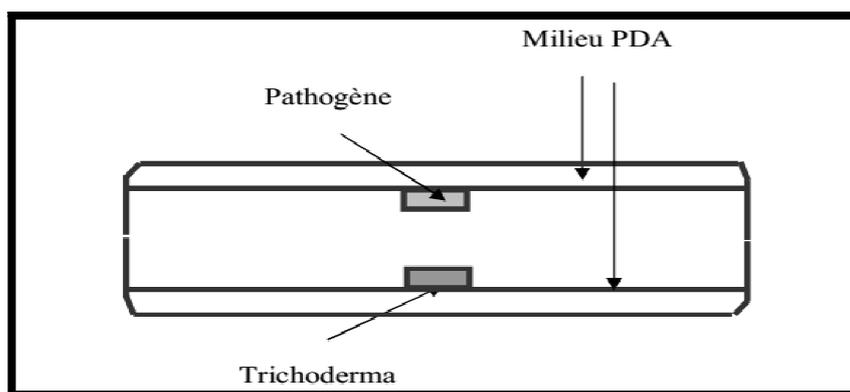
**Figure 08 :** Confrontation entre l'isolat de *Fusarium* et une souche de *Trichoderma* par contact direct sur milieu PDA.

#### 4.2.2 La technique des substances volatiles

D'après (Comporota, 1985), cette technique consiste à déposer au centre de chaque boîte de Pétri contenant le milieu PDA un explant de 8mm de diamètre prélevé à partir des colonies de *Trichoderma* sp et de *Fusarium* sp.

Après 24 heures d'incubation, la partie inférieure contenant le *Trichoderma* est scellé avec un autre contenant le pathogène, par une bande de para film de façon à éviter toute contamination et toute perte de gaz.

Comme pour la première expérimentation, trois répétitions ont été réalisées. Les témoins sont représentés par des boîtes contenant à la face inférieure uniquement le milieu de culture et la face supérieure l'agent pathogène *Fusarium oxysporium* (Benkada et al., 2002).



**Figure 09** : Dispositif utilisé pour tester l'influence des substances volatiles émises par *Trichoderma* sp, sur la croissance et la sporulation de *Fusarium* sp.

### 5. Expression des résultats et analyses statistiques

La fréquence d'isolement des espèces identifiées est calculée uniquement à partir des échantillons ensemencés sur milieu PDA et incubés à 30°C° selon la même formule utilisée pour calculer la charge fongique totale.

Des photos macroscopiques montrant l'aspect morphologique des thalles et des photos microscopiques du mycélium, conidies et chondriogenèse ont été également prises.

Le taux de contamination est calculé selon la procédure décrite par Ponchet (1966). Ce taux représente le nombre de chaque genre fongique isolé sur le nombre total exprimé en pourcentage.

La notation du diamètre moyen des colonies traitées est réalisée lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoins. L'évaluation de l'inhibition exercée par les espèces fongiques est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni et al., 1996) :

$$I(\%) = \frac{C_0 - C_n}{C_0} \times 100$$

Où : I (%) est pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne,  $C_n$  est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste et  $C_0$  le diamètre moyen des colonies témoins.

Les résultats obtenus ont été traités par deux analyses indépendantes à l'aide de logiciel XLSTAT (2008). Trois répétitions sont retenues pour chaque facteur étudié. Les données sont traitées par une analyse de la variance suivie d'une comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls 5 et 1%.

## 1. Histoire taxonomique de *Trichoderma*

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett, 1998 ; Mastapha, 2006 ; Meriem 2010).

Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma* sp., on se rend vite compte que leur positionnement taxonomique n'a pas été chose facile.

1794, Persoon a décrit la première fois sa classification des champignons de taxonomie de *Trichoderma* (Kubicek et Harman, 2002), et établit 4 espèces.

1821, Fries classa les *Trichoderma* sp. parmi les *Gastéromycètes*.

1860, débutent les controverses sur cette systématique, Tulasne contredit Fries puisqu'il ne trouve pas de forme téléomorphes (sexuées) à ce genre. Bien que les genres *Trichoderma* connu depuis le début du 19<sup>ème</sup> siècle et son association avec *l'Hypocrea* detéléomorphe qui a été reconnu par les frères de Tulasne en 1865, sa taxonomie est resté obscur jusqu'aux dernières décennies (Kubicek et Harman .2002).

1871, devant le nombre croissant d'espèces rencontrées, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques sous microscopie optique (surtout les phialides).

1916, Waksman décrit ce qu'il trouve être 6 nouvelles souches de *Trichoderma* sp. En utilisant des critères macroscopiques, différents de ceux préconisés par Harz.

1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères une fois de plus différents des précédents.

1939, Bisbya pense que la variation morphologique pourrait être attribuée à une simple espèce de *Trichoderma viride*.

1963, les travaux de Gutter et Monbasher mettent fin au système précédant, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales (Kubicek et Harman, 2002).

1969 les travaux de Rifai ont été faites la première tentative sérieuse de distinguer morphologiquement des espèces ou plutôt les espèces agrèges, qui ne compte que neuf taxons (Kubicek et Harman, 2002). Neuf espèces agrégées sont découvertes (*T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), (Rifai, 1969; Mastapha, 2006; Meriem, 2010). La plupart des études morphologiques

détaillées des anamorphs ont été effectuées par Bissett (1984, 1991 C.A., 1992 in Kubicek et Harman ., 2002) voir annexe figure 2, D'autres méthodes taxonomiques supplémentaires à la morphologie incluent des études de métabolites secondaires, qui montrent une grande diversité dans ce genre (Okuda et al, 1982 ; Kubicek et Harman .2002). Des profils d'iso enzyme ont été employé en tant qu'efficace outil taxonomique (Leuchtman et al, 1996 ; Samuels et al, 1994).

1984 et 1991, John Bissett prend une nouvelle taxonomie de *Trichoderma*. Des observations microscopiques ont amené à reconnaître environ 35 espèces, dont il réparties dans cinq sections. Manifestement, il y a une grande différence entre neuf espèces d'une part, et 35 sur l'autre.

Au milieu des années 1990, l'analyse des séquences d'ADN a d'abord été appliquées à la taxonomie *Trichoderma*. Séquences d'ADN fourni des données très nécessaires calculées indépendamment, qui permettraient une meilleure compréhension des espèces de *Trichoderma*.

1991, les espèces de *Trichoderma* ont été assignés à quatre sections indiquées comme *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Pachybasium* et *Hypocreanum* (Bissett, 1991 in Hohmann, 2010). Dans le même date Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma* sp., sans rapport avec les espèces agrégées. Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (voir annexe figure 3): *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* (Leuchtman, 1996 ; Landreau, 2001).

2006, de nombreuses nouvelles espèces de *Trichoderma* et *Hypocrea* ont été découvertes, le genre déjà a comporté plus de 100 espèces phylogénétiques définies (Druzhinina et al, 2000 ; Schuster et Schmoll, 2010).

Le système taxonomique de Bissett est aussi appuyé, entre autres, par des approches de biologie moléculaire (PCR), pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement (Lillard-Roberts, 2004). La position taxonomique actuelle des *Trichoderma* sp. Selon Kulkarni et Sagar, (2007), ont mentionné la position taxonomique de *Trichoderma* comme suit :

Tableau I : la position taxonomique de *Trichoderma* (Kulkarni et Sagar, 2007) :

Position	Asexual stage (Conidia)	Sexual stage (Ascospore)
Kingdom	Fungi	Fungi
Phylum	Ascomycota	Ascomycota
Sub-Division	Deuteromycotina	Ascomycotina
Class	Hyphomycetes	Pyrenomycetes
Order	Monilliales	Sphariales
Family	Monilliaceae	Hypocreaceae
Genus	<i>Trichoderma</i>	<i>Hypocrea</i>

La base de données d'index Fungorum égalise actuellement les listes 471 différentes noms pour des espèces de *Hypocrea* et 165 disques pour *Trichoderma*. Actuellement, la commission internationale compte 104 espèces de *Trichoderma* et *Hypocrea*, qui ont été caractérisés au niveau moléculaire. Soixante-quinze espèces de *Hypocrea* ont été identifiées dans l'Europe tempérée (Jaklitsch, 2009 ; Schuster et Schmoll, 2010).

## 2. Description de l'habitat naturel de *Trichoderma*

*Trichoderma* est un genre de mycètes filamenteux qui peuvent sporuler profusément et avoir et peut constituer jusqu'à 3 % de tous les propagules fongiques dans des sols de forêt (Harman et al, 2004; Klein et Eveleigh, 1998; Pinto et al, 2006) elle est largement distribuée dans la matériel végétal, les végétaux en décomposition et le bois. *Hypocrea* sp sont le téléomorphe de certaines espèces de *Trichoderma*, ces dernier se développent dans la litière des feuilles ou de paillis, et elles exigent un minimum de carbone organique de 1% pour assurer la prolifération d'emplacement des cultures (Mérillon, 2012). *Trichoderma* est un mycète septé cela produit des conidiophores fortement embranchés qui rapportent de nombreux phialospores, également appelés conidium. Moins fréquemment trouvé à l'état sexuel (teleomorphe) appartenir au *Hypocrea* (Harman, 2004). Des ascospores sont formées pour la reproduction sexuelle (Kubicek et Harman, 1998 in Hohmann, 2010). Cette espèce est un myco-parasite ou saprophyte qui possèdent des variétés lumineuses de styles de vie biotrophique et saprotrophique (Atanasova et al, 2013), qui se nourrit de champignons pathogènes. Les espèces de *Trichoderma* peuvent se développer sous un éventail de conditions environnementales. Elles sont influencées par des paramètres abiotiques: sol, la température du sol, humidité du sol et pH du sol (Danielson et Davey, 1973; Tronsmo et Dennis, 1978; Domsch et al 1980 in Hohmann, 2010).

### 2.1 Importance de *Trichoderma* dans le monde :

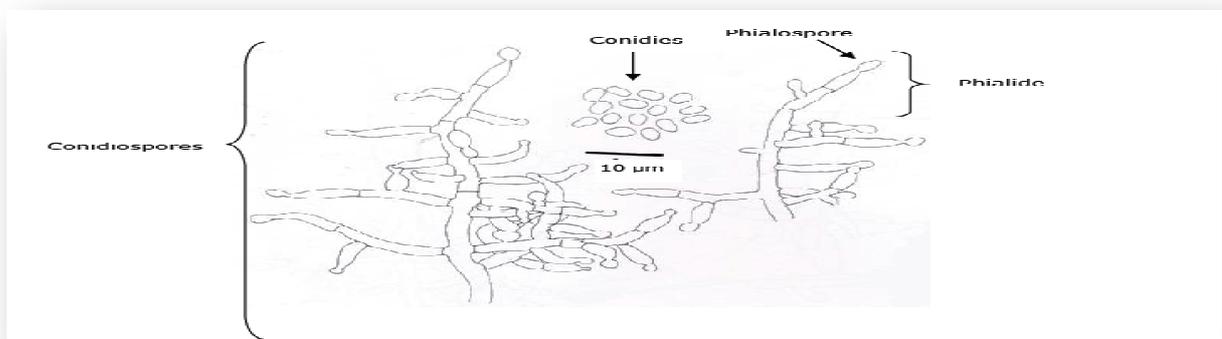
Les espèces de *Trichoderma* sont l'un des petits groupes de champignons bénéfiques comme un agent de la lutte biologique. Ce micro-organisme est maintenant enregistré en tant que bio-fongicide en Inde, France, Royaume-Uni, la Suisse, la Suède, la Belgique, le Chili, la Nouvelle-Zélande et les Etats-Unis. Et en cours dans plusieurs autres pays de façon réglementaire. *Trichoderma* est totalement sans danger pour les humains et le bétail. Il est communément considéré comme un contaminant qui peut causer une infection en la présence de certains facteurs prédisposants, malgré que, environ 55 ans de recherche, il y a eu aucun cas d'effet indésirable enregistré. Les qualités prédatrices de *Trichoderma* sont une grande partie de

l'attrait de ce champignon avec d'autres avantages liés à l'application commerciale (Mérillon, 2012).

### 3. Morphologie de *Trichoderma*

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* sp est apprécié à partir de cultures sur gélose nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Les espèces du genre produisent une large gamme de colorants de jaune-verdâtre lumineux à rougeâtre en couleurs, bien que certains sont également sans couleur. De même la pigmentation conidial change de sans couleur à diverses nuances vertes et parfois également grise ou brune. Autre que la pigmentation, l'identification dans le genre est difficile en raison de la gamme de la variation étroite de la morphologie simplifiée dedans *Trichoderma* (Gams et Bissett 1998 in Schuster et Schmoll, 2010). Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour un feutrage épais se superpose à la culture.

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Fig. 1) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek et al., 2003 in mastapha, 2006 ; Meriem, 2010) voir annexe figure 3.



**Figure 01** : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels et al., 1994 ; Mustapha, 2006).

### 3. 1 Caractéristiques des espèces de *Trichoderma*:

Selon Schuster et Schmoll, 2010 : Les espèces de *Trichoderma* sont des colons omniprésents de cellulosique des matériaux et peuvent souvent s'avérer délabrer là où la matière végétale est disponible (Kubicek et al. 2008 Jaklitsch 2009 in Schuster et Schmoll, 2010) aussi bien que dans la rhizosphère du sol, où ils peuvent induire la résistance systémique contre des agents pathogènes (Harman, 2000 in Schuster et Schmoll, 2010).

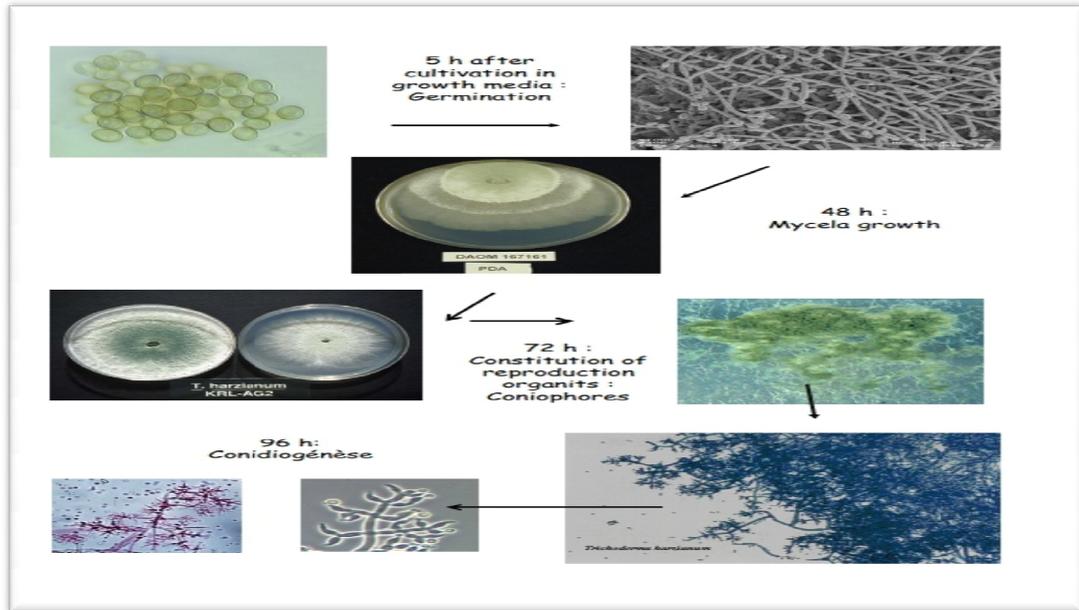
### 4. Biologie de *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* est introduit il ya plus de 200 ans (Persoon, 1794). C'est un champignon tellurique et cosmopolite, remarquable par sa croissance rapide et sa résistance aux produits chimiques nocifs.

*Trichoderma* est un champignon asexué. Les conidiospores représentent la phase dominante de la multiplication. Dans des conditions appropriées, les spores germent, donne un mycélium, constitue des hyphes ramifier, nouvelles conidiospores sont formés dans des phialides (Rifai, 2004).

Les espèces de *Trichoderma* peuvent se développer sous un éventail des conditions environnementales. Elles sont Influencées par des paramètres abiotiques, dont le plus importants la température, l'humidité et le pH du sol (Danielson et Davey, 1973., Tronsmo et Dennis, 1978., Domsch *et al.*, 1980 in Hohmann, 2010).

Selon l'espèce, la croissance mycélienne est accomplie aux températures comprises entre 0 à 40°C. Le point thermique de mortalité dans le sol est de 49°C à 55°C pendant 30 minutes. Le pH doit être compris entre 1.5 et 9, dont le pH optimum est de 4,5 à 5,5 (Meriem, 2010). L'humidité de sol peut être un facteur limitant pour la plupart des espèces de *Trichoderma*. La croissance de *Trichoderma* a été observée au potentiel de l'eau de sol aussi bas que 7 MPa (courtisez *et al*, 2006 ; Hohmann, 2010).



**Figure 02 :** Cycle biologique de *Trichodermasp* (Rifai, 2004).

## 5. Chimie de *Trichoderma*

### 5.1. Production de métabolites intéressants

La mise en évidence de la production des métabolites secondaires par *Trichoderma* sp a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et al., 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990). La littérature ne cite que les métabolites importantes de *Trichoderma* sp qui sont principalement des enzymes et des molécules bioactives. Le travail de thèse de Landreau (2001) ayant présenté une synthèse bibliographique sur ces groupes de produits, nous ne les citons ici que très succinctement :

#### 5.1.1. Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre. Principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren et al., 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et al., 2003 ; Mastaph, 2006 ; Meriem, 2010).

#### 5.1.2. Rappel sur les mycotoxines

Les mycotoxines sont des molécules de structures chimiques très diverses issues du métabolisme secondaire de la plupart des champignons (même en culture in vitro), souvent excrétés dans le milieu environnant (Frisvad, 1990 ; Demain & Fang, 2000 ; Miller, 2000).

Leur production dépend des conditions environnementales régissant des facteurs intrinsèques et extrinsèques (composition des substrats naturels, température, pH, taux d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, compétitivité microbienne...) (Frisvad et Samsom, 1991).

Certaines mycotoxines jouent le rôle de signaux internes pour la différenciation cellulaire (ex. la sporulation) (Vining, 1990), mais elles sont plus remarquées pour leur bio activité. Plus de 40% de ces toxines fongiques induisent de puissants et nombreux effets biologiques aigus ou chroniques. Certaines sont cancérigènes (ex.ochratoxines), mutagènes (ex. aflatoxines), hémorragiques, dermatotoxiques (ex.trichotécènes), neurotoxiques (ex. parixilline), cytotoxiques ou antimicrobiennes.

Dans certaines conditions, leur production est décisive pour l'existence des organismes producteurs, inhibant le métabolisme primaire d'autres espèces compétitives et antagonistes (animales, végétales ou microbiennes) dans leur écosystème afin d'y conforter leur présence (Frisvad, 1990 ; Demain & Fang, 2000; Miller, 2000 ; Mustapha, 2006).

## **6. Mode d'action de *Trichoderma***

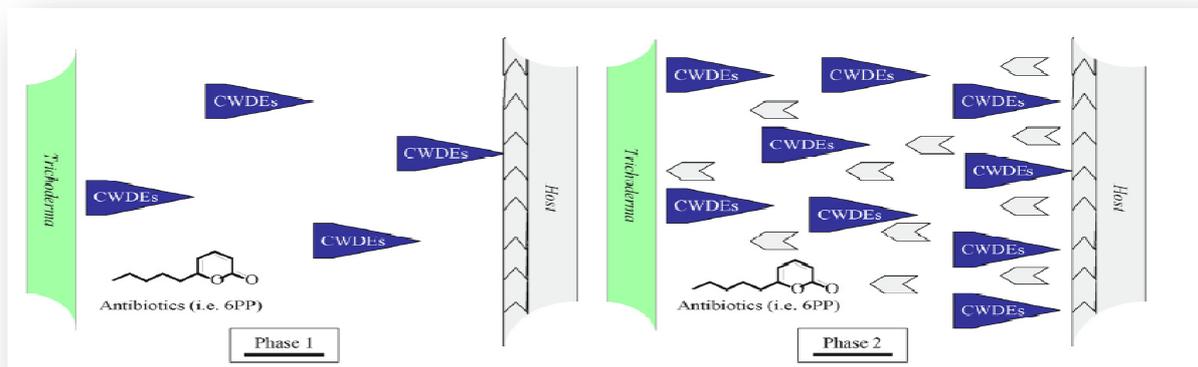
Les capacités antagoniques de l'espèce *Trichoderma* ont été découvertes il y a 70 ans (Weindling, 1932 in Bandyopadhyayl et Cardwel, 2003). Les propriétés antagonistes du *Trichoderma* ont été mentionnées pour la première fois par Vuillemin en 1887 (cité dans Lamy Krafft et Roquebert 1981). Ce n'est toutefois qu'en 1971 que Dennis et Webster ont pu élucider les différents mécanismes d'action de ce champignon antagoniste qui incluent principalement le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition pour les nutriments et l'espace (Dennis et Webster 1971a, b, c). (Mouria et al, 2007).

### **6.2.1. Mycoparasitisme de *Trichoderma***

Le mécanisme primaire de l'antagonisme de *Trichoderma* est le mycoparasitisme. L'activité lytique est le dispositif principale responsable de l'expression du mycoparasitisme contre plusieurs microbes pathogènes fongiques (Chet, 1987 in Bandyopadhyayl et Cardes, 2003).

Mycoparasitisme décrit le type d'interactions bio trophique dans aux dépens lesquelles les organisations bénéficient des mycètes (Druzhinina, et al 2011 inAtanasova, 2013). Dans un large sens cette propriété est la plupart proliféré chez la famille fongique *Hypocreaceae*, et la capacité de contrarier, parasitent ou même tuent les autres champignons (hyperparasitisme, mycotrophique ou necrotrophique) (Atanasova, 2013).

Le processus complexe du mycoparasitisme se compose de plusieurs événements, y compris l'identification du centre serveur, attaque et pénétration et massacre suivants. le *Trichoderma* ceci pendant de processus sécrète CWDEs qui hydrolysent mur de cellules du mycète de centre serveur, libérant plus tard oligomères du mur de cellules de l'agent pathogène (Kubicek et al., 2001; Howell 2003; Woo et al., 2006). On le croit cela *Trichoderma* sécrète les enzymes hydrolytiques à un constitutif nivelez et détectez la présence d'un autre mycète par la sensation les molécules ont libéré du centre serveur par enzymatique dégradation (Harman et al., 2004; Lorito et al., 2006; Woo et Lorito, 2007—Fig. 3).



**Figure 03 :**Pré-mettez en contact les événements du mycète mycoparasitique de centre serveur —de *Trichoderma* d'interaction.

Le déploiement des modes d'actions varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc...). *Trichoderma* est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive. Il permet, au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines pulvérisation aérienne. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes. (Johanne Caron., 2002 in Meriem, 2010).

Le raisonnement de contrôle des agents biologiques pathogènes des plantes par mycoparasites (hyperparasites) remonte à Weindling. Il a découvert que *Trichoderma lignorum* serait parasiter un certain nombre de champignons transmises par le sol dans la culture et suggéré le contrôle de certains champignons pathogènes en augmentant le sol avec une abondance de cette mycoparasite. Des commentaires exhaustive sur le sujet ont été publiés dans la pâte montrant la production de chitinases briser les parois des cellules de mycélium de champignons phytopathogènes comme une cause majeure de l'activité biologique (Mérillon,

2012).

Exemple de *T. viridemyco* parasite des différents agents pathogènes : *Actinomucor elegans*, *Armillaria mellea*, *Athelia rolfsii*, *Cachliobolus sativus*, *Circinella muscae*, *Fusarium oxysporium*, , *Gaeumannomyces graminis*, *Lentinus edodes*, , *Mucor plumbeus*, *Phaeolus schweinitzii*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora citrophthora*, *Pythium* sp, *Phycomyces nitens*, , *Rhizopus oryzae*, *Rhizoctonia solani* ... (Domsch., 1993 in Meriem, 2010).

### 6.2.2 Antibiotiques

Dans le cas d'un mode d'action par antibiose, l'organisme antagoniste produit des métabolites secondaires toxiques pour l'agent pathogène cible. Ces métabolites produits à faibles concentrations peuvent inhiber la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents pathogènes (Montesinos et al., 2009). L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de protection biologique (Jacobsen, 2006). Haas et Kell (2003) ont décrit les conditions de production optimale de ces composés in vitro ( Sakhr , 2009).

Ils de ce fait, non seulement antibiotiques potentiels (pour exemple les peptaibols) mais également mycotoxines et plus que 100 métabolites avec l'activité antibiotique comprenant des polyketides, les pyrones, terpènes, métabolites ont dérivé d'acides aminés, et polypeptides (Sivasithamparam et Ghisalberti 1998 in Schuster et Schmoll, 2010). Ils ont été classifiés par Ghisalberti et Sivasithamparam (1991) dans trois catégories:

1. antibiotiques volatil, c.-à-d. 6-pentyl-a- pyrone (6PP) et les la plupart de dérivés d'isocyanide;
2. composés hydrosolubles, c.-à-d. Acide heptelidique ou acide koningique;
3. peptaibols, qui sont les oligopeptides linéaires de 12 –22 acides aminés riches dedans a – acide aminoisobutyrique, N-acétylé chez le N-terminus et contenant un alcool aminé (Pheol ou Trpol) au C-terminus (Le Doan et autres, 1986; Rebuffat et al., 1989 in Vinale et al., 2008).



**Figure 04 :** Inhibition de croissance de *Pythium ultimum* par l'antibiotique 6PP de *Trichoderma harzianum* (Vinale et al, 2008).

L'antibiose qui repose sur ces composés est une des composantes d'un ensemble complexe de mécanismes dont la combinaison détermine l'efficacité du biopesticide. Ainsi, des effets de synergie inhibant la germination et/ou l'élongation des hyphes de différents agents phytopathogènes ont été observés entre enzymes lytique et antibiotiques produits par *T. harzianum*. La séquence de formation et d'action d'antibiotique et des enzymes lytique produits par une souche de *T. harzianum* parasitant *B. cinerea* été étudiée en microscopie électronique. Une invagination du plasmalemme et une désorganisation du cytoplasme de *B. cinerea* ont été observées 12 heures après le contact entre les deux champignons, aboutissant à la mort cellulaire 36 heures plus tard. Par contre, la préparation de *T. harzianum* dans les cellules de *B. cinerea*, dues à des pressions mécaniques et des digestions très localisées des parois du pathogènes, n'est observable que trois jours après le contact entre les deux espèces, la dégradation de la chitine de *B. cinerea* n'étant clairement observée que 7 jours plus tard. L'action des antibiotiques produits par *T. harzianum* menant à la mort cellulaire de *B. cinerea* précède donc la dégradation des parois de celui-ci (Iepovre, 2003).

### **6.2.3. Compétition entre *Trichoderma* et agents pathogènes**

La compétition qui se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma* à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes mais *Trichoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables (Meriem, 2010).

Selon Hanhong, (2011), Les espèces de *Trichoderma* ont une capacité supérieure à tolérer de nombreux composés toxiques. La compétition pour les nutriments limité saboutit parfois à la famine d'autres microbes, provoquant la lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes. Par exemple, l'absorption du fer est essentielle à la survie dans la plupart des champignons filamenteux. Quand le fer ne suffit pas, la plupart des champignons produisent à faible poids moléculaire chélateurs spécifiques ferrique en fer appelés sidérophores de mobiliser fer de l'environnement. Certains *Trichoderma* isole produire efficacement siderophores, qui se traduisent par l'arrêt de la croissance chez les champignons concurrents. Cela indique l'importance de la composition du sol en termes de disponibilité de fer.

**Par exemple1**, la concurrence se produit entre le *T. harzianum* T35 et *Fusarium oxysporum* pour la colonisation de rhizosphère et nutrition. La concurrence devient plus agressive quand diminution 63 d'éléments nutritifs de sol. Les espèces de *Trichoderma* ont a mécanisme puissant pour mobiliser et acquérir des aliments de sol en obtenant le triphosphate d'adénosine du métabolisme de différents sucres comme la cellulose, le glucane et la chitine Il

Il y a plusieurs clés composantes pour le métabolisme de glucose comprenant l'assimilation enzymatique, perméases, protéines impliquées dans la membrane et modifications de mur de cellules aussi bien que le transport de glucose système (Hanhong, 2011).

**Exemple2 :** La compétition pour les éléments nutritifs entre *Trichoderma* et *Pythium ultimum* (agent responsable de fonte de semis chez de nombreuses céréales et plantes maraichères), a été suggérée par l'observation d'une colonisation rapide par l'agent de lutte biologique corrélée avec la diminution des symptômes, mais d'autres mécanismes existent. Ainsi, certains isolats de *Trichoderma* sont capables de métaboliser rapidement les exsudats des graines, diminuant concomitamment la germination des sporanges de *Pythium*; ce processus n'est cependant pas suffisant, les souches de *Trichoderma* devant coloniser rapidement et à forte densité l'extrémité des racines, qui représente le site d'infection de *Pythium* (Iepoivre, 2003).

## **7. Applications des *Trichoderma* dans la lutte contre les phytopathogènes :**

Des résultats encourageants ont été obtenus au cours de recherches de lutte biologique contre les pathogènes cryptogamiques du sol à l'aide de *Trichoderma* spp. L'action positive de ces antagonistes a été étudiée sur les champignons (*Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum*) responsables de la fonte des semis, de la pourriture des racines et de la pourriture précoce de la tige du maïs et du sorgho. Sur fraisier, les traitements avec *Trichoderma* spp. se sont révélés très satisfaisants contre les attaques de *Botrytis cinerea* sur fruits ainsi que contre le pied-noir d'été après repiquage. En ce qui concerne la fusariose et la verticilliose de la tomate, excellents résultats ont été obtenus pour la réduction des maladies et l'augmentation des rendements. Les travaux pour combattre la pourriture du collet de la laitue (*Sclerotinia minor*) ont également donné de bons résultats. Les possibilités de transposition dans la pratique de ces résultats, obtenus généralement en conditions d'inoculation artificielle, sont étudiées (D'Ercole et al., 2008).

Les *Trichoderma* présentent une activité antagoniste et d'hyperparasitisme à l'égard d'un grand nombre de microorganismes (particulièrement ceux du sol), et sont utilisés en lutte biologique à l'égard de diverses maladies sur différentes cultures (voir l'annexe tableau 3) (Chet, 1987). Ils peuvent jouer également un rôle dans l'élicitation des mécanismes de défense de la plante (Shigo et al., 1977). Selon Hunt et al., (2001), l'application de *Trichoderma* sur les plaies de taille réduit fortement la colonisation du bois par *Eutypalata* (-85%). De même, Di Marco (2003) montrent que l'application d'une souche de *Trichoderma harzianum* sur les plaies de taille empêche le développement de *Phaeoconiella chlamydospora*. De nombreux travaux ont

démonstré que les *Trichoderma* ont un potentiel de lutte intéressant contre divers agents. Leur commercialisation a favorisé leur utilisation en agriculture.

L'effet antagoniste de *Trichoderma harzianum* se manifeste par un enroulement des hyphes autour des filaments du champignon pathogène. S'ensuit une lyse grâce à la production d'enzymes, telles que la  $\beta$ -1,3-glucanase et la chitinase (Berber et al, 2009). Quelques efforts ont été faits pour lutter biologiquement contre l'infection des grains et les cultivars de pois chiche. Padwik, (1941) cité par (AkhtarAyyub, 2001) suggère que les espèces de *Trichoderma* possèdent une activité antagoniste très élevée vis-à-vis du FOC. Les travaux menés par Zaim, (2007) sur le contrôle biologique par les isolats de *Trichoderma* sp, ont démontré l'efficacité de cet agent biologique sur le développement du FOC avec une réduction de 76.67% de l'intensité de la maladie.

Kaur, (1992) a mentionné que l'application de *Trichoderma harzianum* avec des fongicides réduit la fréquence de la maladie jusqu'à 63.3%. Cependant, la maladie a été réduite à 29.9% après l'utilisation des fongicides uniquement.

Gupta, (2006) a prouvé l'efficacité de *Trichoderma viridea* contre le complexe du flétrissement, et en particulier sur le FOC, il diminue l'incidence de la maladie jusqu'à 83%. Les champignons du genre *Trichoderma* sont généralement utilisés comme produit de base pour de nombreuses préparations phytosanitaires, destinées au traitement des maladies cryptogamiques. Ainsi, le brevet FR 2 841 436 décrit une composition de micro-organismes utilisée pour combattre certaines maladies cryptogamiques touchant la vigne, telles que l'esca ou l'eutypiose. Cette composition est constituée d'un mélange d'une bactérie, d'une levure et d'un champignon, notamment une souche de *Trichoderma*. Le brevet FR 2 8694 832 décrit une souche particulière de *Trichoderma harzianum* constituant la base d'un produit phytosanitaire destiné à la lutte biologique de maladies cryptogamiques du bois de vigne, telles que l'esca ou l'eutypiose.

**Tableau II :** Applications des *Trichoderma* dans la lutte contre les phytopathogènes

<b>Agent de lutte</b>	<b>Agent pathogène</b>	<b>Culture concerné</b>	<b>Référence</b>
<i>T. harzianum</i>	<i>Colletotrichum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Haricot	Mhamdi, 2011
<i>Trichoderma viride-Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	Luzerne	Mhamdi, 2011
<i>Trichoderma</i>	Pathogènes du sol	Le sol des	Akram, 2008

<i>harzianum</i>		serres, Pépinières, gazon, jardins d'amateur	
<i>T. stilbohypoxylis</i> . et <i>T. theobromicola</i>	<i>Capsici de Phytophthora</i>	Jeunes plantes de poivre	Hanhong, 2011
<i>T. asperellum</i> .	<i>Fusarium oxysporum</i>	Pomme de terre 73%	Ommati et Zaker, 2012
<i>T. atroviride</i> <i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> fsp <i>Ciceris</i>	Pois chiche ( <i>Cicer arietinum</i> )	Souâd, 2008
<i>T. viride</i>	<i>Botrytis</i> <i>Cinerea</i>	La laitue	1952, Wood in Meriem, 2010
<i>T. harzianum</i>	<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i> , <i>solani</i> de <i>fusarium</i> et <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	De jeune plante de coton	Asran-Amal et al. 2010
<i>T. harzianum</i> + <i>B. thuringiensis</i> 95%	<i>F. oxysporum</i> f.sp	Lafusariosedes racineset ducolletdelatom ate	Hibar, 2007
<i>T. virens</i>	<i>Rhizoctonia</i> <i>Solani</i>	Cotton	Hanson; Howell, 2000
<i>Trichoderma gamsii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Champ de betterave à sucre	Anees et al, 2010
<i>T. harzianum</i>	<i>Phytophthora</i> <i>capsici</i>	Poivre	Ahmed, 2000
<i>T. harzianum</i>	<i>Xanthomonas</i> <i>oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> <i>Magnaporthe</i>	Riz	<i>Harman, 2006</i>
<i>T. harzianum</i>	<i>Graminicola</i> <i>colletotrichum</i>	Maïs	<i>Harman, 2006</i>

<i>T. harzianum</i>	<i>Alternaria solani</i>	Tomate	Seaman, 2003
<i>T. harzianum</i>	<i>Colletotrichum</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>lindemuthianum</i> ;	Haricot	Bigirimana, J. et al, 1997 in Harman, 2004.
<i>T. harzianum</i>	<i>B. cinerea</i>	Poivre, Tabac, Laitue, Haricot	
<i>T. harzianum</i> <i>T.virens</i>	virus de mosaïque <i>Vert-marbrure</i>	Concombre	Lo et al, 2000
<i>Trichoderma</i>	<i>phaseolina</i> de <i>Macrophomina</i>	Fraise	Roskopf, 2011
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Fusarium de culmorum</i>	Blé	Campbell, 2003
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. adzuki</i> et <i>Pythium arrhenomanes</i>	Soja	Rojan et al, 2010
<i>Trichoderma viride.</i>	botrytis cinerea	Kiwi Fraise	Pratella and Mari, 1939
<i>T.harsianum</i>	<i>G.graminis var. tritici,</i>	Blé	Karlovsy, 2008
<i>T.spirale, T.virens , T.asperellum et T.harzianum</i>	<i>Phytophthora palmivora</i>	cabosses de cacaoyer	Mpika, 2009

## 1. Histoire et développement de la lutte biologique

La première étude scientifique qui amorça le déclenchement de la lutte biologique moderne est due à l'entomologiste américain C. V. Riley. Une cochenille, *Iceryapur chasi*, fut introduite accidentellement d'Australie en 1868 dans des vergers d'agrumes de Californie. Riley, convaincu que l'innocuité de cette cochenille dans son pays d'origine était due à des antagonistes, dont la coccinelle *Novius cardinalis*. Élevé en masse, cet auxiliaire fut distribué aux agriculteurs ; le résultat fut spectaculaire car, en moins de deux ans, les effectifs de la cochenille furent amenés en un seuil de nuisibilité économiquement acceptable (Jourdeuil et al, 2002).

Les premières tentatives de lutte biologique menés dans les années 1980 étaient concentrées sur l'évaluation d'un champignon pathogène (*Phragmidium violaceum*) qui provient d'Europe et provoque une rouille sur cette dernière (Amor et al., 1998., Bruzzese et Lane, 1996).

La naissance de l'idée fondamentale de l'utilisation de l'inoculum microbien dans le contrôle biologique remonte à plus d'une soixantaine d'année (Taou, 1996).

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, quasi simultanément en phytopathologie et entomologie, l'appellation lutte biologique fut proposée pour désigner toute méthode phytosanitaire mettant en œuvre des organismes vivants.

En 1926 l'étude de Weindling met en évidence que le champignon *Trichoderma lignorum* parasitait d'autres champignons du sol (Le poivre, 2003).

En 1963 Risbeth a utilisé pour le biocontrôle de la maladie pourridié des résineux, causée par *fomesannosus*, l'agent cryptogamique *Peniophora gigantea* (Reddy, 1991). Ce champignon est l'un des premiers agents de lutte biologique qui a été commercialisé. Son utilisation reste courante jusqu'à présent (Toau, 1996). Il a été le premier succès pratique de la lutte biologique au sens strict (Corbaz, 1990). A partir de cette période, de nombreux chercheurs ont orienté leurs travaux vers l'utilisation d'antagonistes microbiens contre d'autres microorganismes phytopathogènes (Taou, 1996). D'après Campbell, (2003) les trois phases principales dans l'histoire du contrôle biologique sont : l'utilisation préhistorique et traditionnelle de la culture et de manipulation qui peut mener pour commander par des moyens biologiques. Deuxièmement, la croissance régulière de l'information pendant environ 60 années du siècle précédant, ce qui dans les dernières 20 ans a considérablement accru en volume. Troisièmement, là est la situation actuelle de la recherche étendue dans beaucoup de parties demandés (beaucoup de différentes

maladies étant étudiés) qui est pour la première fois les niveaux raisonnables du placement du gouvernement agences de recherches et des intérêts commerciaux.

## **2. Définition et objectifs de la lutte biologique**

Il existe de nombreuses définitions de la lutte biologique mais nous en tiendrons à une définition générale celle proposée par Van Driesche et Bellows (1996) : « La lutte biologique est un processus agissant au niveau des populations et par lequel la densité de population d'une espèce est abaissée par l'effet d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénéicité ou compétition ». La lutte biologique est donc l'utilisation d'organismes vivants dans le but de limiter la pollution et/ou la nocivité des divers ennemis des cultures « rongeurs, insectes, nématodes, maladies des plantes et mauvaises herbes » (Vincent et Coderre, 1992; Eilenberg et al., 2001., Jourdheuil et al., 2002).

Selon l'OILB : utilisation d'organismes vivants biopesticides, qui désigne aussi bien des organismes vivants que des substances inertes d'origine biologique, ou encore des produits phytosanitaires dits « biocompatibles », substances actives vivantes ou inertes d'origine biologique ou non, qui peuvent être employées en lutte intégrée) (parasitoïdes, prédateurs, pathogènes, antagonistes ou compétiteurs) pour prévenir ou réduire les dégâts causés aux cultures par des ravageurs ou des maladies (Schiffers et Wainwright, 2011).

## **3. Importance de la lutte biologique**

La lutte biologique est née d'un certain échec de la lutte chimique, essentiellement dû à de nombreux abus, à la présence des résidus qu'à une absence de vue globale des différents problèmes ; en particulier l'impact sur l'environnement. Les traitements chimiques deviennent dans certains cas insupportables sur le plan économique (Corbaz, 1990). Pour ces raisons la lutte biologique est une alternative viable de la lutte chimique (kouassi, 2001)

Selon Lefort (2010), la lutte biologique présente beaucoup d'avantage:

- ✓ Exposition fortement réduite de cultivateurs et des personnels de jet aux pesticides toxiques.
- ✓ Manque l'effet toxique sur les plantes et aucun avortement prématuré des fruits et des fleurs et augmentations de rendement.
- ✓ La lutte biologique est permanente.

- ✓ La lutte biologique est appréciée par le grand public à cause de sa sécurité et sa réussite.
- ✓ Faible risque de la nourriture, de l'eau et de la pollution environnementale.
- ✓ Contribution à la production acceptable de nourriture.
- ✓ Contribution à la production ou même à la biodiversité.
- ✓ Aucun résidu de pesticide sur la nourriture.
- ✓ Efficace.
- ✓ Permet de diminuer les risques d'apparition de résistances aux produits chimiques.
- ✓ Plus grande spécificité d'action.
- ✓ Faible coût de développement.

Les microorganismes destinés aux bio-contrôles doivent être considérés à la biologie plutôt que chimique (Bellows et Fisher, 1999). Plusieurs recherches ont essayé des traitements chimiques ; les résultats quelquefois positifs ne permettent cependant pas leur utilisation en raison des divers inconvénients (Ousalah, 2003), (voir annexe tableau I ; II).

#### **4. Principes de technique de lutte biologique**

Selon Toua, (1996), les techniques de lutte biologique font appel à deux principes :

- La réduction de l'inoculum infectieux pendant la phase de conservation ou de survie du pathogène et / ou l'interférence avec le processus d'infection de la plante hôte.
- Le contrôle biologique des agents pathogènes s'exerce en détruisant l'inoculum infectieux, en l'inactivant ou réduisant sa virulence.

#### **4.1. Étapes du développement de la lutte biologique**

Les étapes nécessaires pour passer d'un phénomène naturel d'antagonisme entre deux microorganismes à un biopesticide opérationnel, sont nombreuses (voire l'annexe figure1); elles doivent être considérées globalement, chacune d'elles étant essentielle et complémentaire des autres. Ce processus de développement est confronté à des exigences biologiques, techniques, économiques et réglementaires imposées par l'industrie, l'utilisateur, le consommateur et les instances officielles d'homologation des produits phytosanitaires (Le poivre, 2003).

D'après Lefort, (2010), les étapes de développement d'un organisme de lutte microbiologique sont les suivantes :

- Identifier un microorganisme antagoniste d'un pathogène/ravageur ou plante adventice.
- Sélectionner des souches efficaces et conservation de la variabilité.
- Connaître l'écologie de l'antagoniste, ses modes d'action et sa relation envers la cible.
- Réaliser les études toxicologiques.
- Mettre au point la technique de production (fermenteurs) et de formulation (substances porteuses).
- Intégrer à d'autres techniques de lutte.
- Réaliser des essais multi locaux.
- Elaborer le dossier d'homologation en vue de la commercialisation.

#### **4.2. Isolement et sélection des agents de lutte biologique**

L'isolement et la sélection d'un agent de lutte biologique sont les deux premières étapes qui conditionnent la réussite des phases ultérieures du développement d'un biopesticide. Il s'agit d'identifier des souches microbiennes qui rencontrent les critères qui doivent satisfaire un organisme de lutte biologique (Lepoivre, 2003., Agrios, 2005). D'après Lepoivre, (2003), la connaissance des caractéristiques de la microflore associée à l'organe à protéger permet la sélection antagoniste adaptée aux sites d'application et compétitifs vis-à-vis des autres microorganismes naturellement présents sur la plante. Les populations microbiennes saprophytes colonisant les plantes, ainsi que leurs écologies, restent encore mal connues. Cette lacune se comble progressivement grâce au développement de techniques moléculaires qui permettent d'évaluer la dynamique des populations présentes à la surface des plantes ou organes végétaux (Lepoivre, 2003).

Une collection de souches microbiennes doit être constituée afin d'entamer la sélection des antagonistes les plus efficaces.

La meilleure période d'isolement des antagonistes potentiels dépend souvent du pathogène à combattre et de l'étape du cycle infectieux visé (Lepoivre, 2003).

Selon Lepoivre, (2003), les Critères de sélection des agents de lutte biologique sont :

- Stabilité génétique
- Efficacités à faible concentration
- Faible exigence nutritionnelle
- Capacité de survie et d'adaptation aux différentes conditions environnementales
- Efficacités sur un grand nombre de pathogènes et d'hôtes

- Production aisée et peu coûteuse (production en masse)
- Préparation facile efficace de l'inoculum (produit formulé)
- Absence de production de métabolites secondaires toxiques
- (Toxicologie, éco-toxicologie)
- Résistance aux pesticides
- Compatibilité avec d'autres traitements
- Non pathogénicité pour l'homme et éco-toxicologie acceptable.

## **5. Écologie des agents de lutte biologique**

Le développement et la dispersion des microorganismes sont influencés par différents facteurs environnementaux. Il s'agit principalement des conditions climatiques (température, humidité relative, pluie, rayonnement,...), des éléments nutritifs (sucres, acides aminés, cires, pollen, miellat de puceron,...), du cultivar de la plante-hôte, des autres organismes occupant le même site ou encore la présence de pesticides. L'impact de tous ces facteurs ne peut être étudié que si l'on se dote d'outils de traçage des agents de lutte biologique permettant de les identifier et quantifier dans l'environnement (sol, phyllosphère, rhizosphère, eaux) où ils ont été introduits. Le traçage permet d'estimer l'adaptation et la survie de l'antagoniste parmi la microflore naturellement présente et d'évaluer l'efficacité des différentes formulations et méthodes d'application de l'antagoniste en relation avec sa persistance dans l'environnement. Outre son apport dans les connaissances de l'écologie de l'agent de lutte biologique, le traçage constitue une exigence des procédures d'homologation et peut également avoir comme objectif d'identifier la souche d'intérêt afin de protéger la loi de sa commercialisation. Les méthodes de traçage s'appuient sur les techniques biologiques conventionnelles et les techniques moléculaires (Lepoivre, 2003).

## **6. Production et formulation**

Lorsque le nombre de souches candidates est suffisamment réduit, les propriétés technologiques des microorganismes (principalement l'aptitude à la production en masse et à la formulation doivent être évaluées à leur tour.

La production et la formulation doivent aboutir à un produit qui possède plusieurs caractéristiques essentielles : stabilité pendant le stockage, facilité de préparation et d'application

avec le matériel standard dont dispose l'agriculteur, coût de revient compatible avec les exigences de rentabilité du producteur de la souche et de la filière de production.

Les prix de revient de la production et de la formulation d'un biopesticide inclus le coût du milieu culture et des adjuvants de formulation, ainsi que celui de l'énergie nécessaire à la conduite de culture et au séchage de celle-ci (Lepoivre, 2003).

**PARTIE 4 :**  
**CONCLUSION ET RÉSUMÉ.**